

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-210158
(43)Date of publication of application : 29.07.2003

(51)Int.CI. C12N 1/00
B03C 1/00
// C12Q 1/02

(21)Application number : 2002-015201 (71)Applicant : AQUAS CORP
(22)Date of filing : 24.01.2002 (72)Inventor : KONO HAJIME
INOUE HIROAKI

(54) METHOD FOR CONCENTRATING MICROORGANISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a simple and inexpensive method with general-purpose properties for concentrating a microorganism in which energy is effectively saved without requiring centrifugal separating operation, membrane separating operation, or the like, in a method for concentrating the microorganism in a sample as a live microorganism.

SOLUTION: This method for concentrating the microorganism comprises an attracting and magnetic separation step of attracting the microorganism in the sample to magnetic substance particles and carrying out magnetic separation utilizing magnets and an elimination step of eliminating the microorganism attracted to the magnetic substance particles with an elimination treating liquid and recovering the live microorganism.

(19)日本国特許庁 (JP)

(22) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-210158

(P2003-210158A)

(23)公開日 平成15年7月29日 (2003.7.29)

(51)IntCl⁷

識別記号

F 1

テヤード(参考)

C 12 N 1/00

C 12 N 1/00

Z 4 B 0 6 3

B 03 C 1/00

B 03 C 1/00

A 4 B 0 6 5

// C 12 Q 1/02

C 12 Q 1/02

審査請求 未請求 請求項の数 5 O.L (全 7 頁)

(20)出願番号

特願2002-15201(P2002-15201)

(71)出願人 000161042

アクアス株式会社

東京都目黒区洗足2丁目22番5号

(22)出願日

平成14年1月24日 (2002.1.24)

(72)発明者 河野 淳

茨城県つくば市緑ヶ原4-4 アクアス株
式会社つくば総合研究所内

(72)発明者 井上 浩章

茨城県つくば市緑ヶ原4-4 アクアス株
式会社つくば総合研究所内

(74)代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物濃縮方法

(57)【要約】

【課題】 試料中の微生物を生菌として濃縮する方法において、遠心分離操作や膜分離操作等を必要とせず、しかも低成本で省エネルギーに有効であり、且つ簡便で汎用性のある微生物濃縮方法を提供すること。

【解決手段】 試料中の微生物を磁性体粒子に吸着させ、磁石を利用した磁気分離を行う吸着・磁気分離工程と、前記磁性体粒子に吸着された微生物を脱離処理液で脱離し生菌を回収する脱離工程とを有することを特徴とする微生物濃縮方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の微生物を磁性体粒子に吸着させ、磁石を利用した磁気分離を行う吸着・磁気分離工程と、前記磁性体粒子に吸着された微生物を脱離処理液で脱離し生菌を回収する脱離工程とを有することを特徴とする微生物濃縮方法。

【請求項2】 磁性体粒子が、四三酸化鉄(Fe₃O₄)であることを特徴とする請求項1記載の微生物濃縮方法。

【請求項3】 脱離処理液が、リン酸塩、硫酸塩及びエチレンジアミン四酢酸塩から選ばれる1種又は2種以上の組合せを含有する塩溶液であることを特徴とする請求項1又は2記載の微生物濃縮方法。

【請求項4】 脱離処理液の塩濃度が、0.1～25.0 mmol/lであることを特徴とする請求項1乃至3のいずれかに記載の微生物濃縮方法。

【請求項5】 脱離処理液のpHが、5.5以上8.5以下であることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の微生物濃縮方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、微生物濃縮方法に関し、詳しくは、遠心分離操作や膜分離操作等を必要とせず、しかも低コストでエネルギー消費が少なく、且つ簡便で汎用性のある微生物濃縮方法に関するものである。本発明において、微生物濃縮方法とは、環境水等、一般に菌数の少ない試料中の微生物の検査等にあたり、試料中の微生物濃度を上げるために、微生物を生きた状態で(生菌として)濃縮する方法を言う。

【0002】

【従来の技術】 近年、冷却塔用冷却水、下水処理水、排水処理水、温浴水、河川水などの環境水中に生存している微生物の中には、ヒト・動物への感染等で人間社会への影響が懸念される細菌やウイルスなどの微生物が存在することが知られるようになり、その検査の重要性が認識されると共に、新しい検査技術の開発が求められている。

【0003】 しかし、これら環境水中の微生物の多くは菌数が少なく、微生物濃度を上げるために濃縮操作が必要とされるが、微生物は粒径が小さいため、一般的の水処理に用いられる固液分離技術の中で、水中の微生物濃縮に適用できる技術は限られている。重力式分離法では、微生物は粒径も小さく、また比重も水に近いため、自然沈降による分離は困難であり、凝集沈殿法や遠心分離法が用いられる。一方、ろ過式分離法では、精密ろ過や助剤ろ過が用いられている。

【0004】 重力式分離法のうち凝集沈殿法は、凝集剤と微生物が結合して形成されたフロックを脱水機等により濃縮分離する方法であり、主に排水処理の余剰汚泥分離に使われている。しかし、凝集沈殿法では、濃縮度は

低く、また、分離回収されたフロックから微生物と凝集剤を分けることは難しく、回収された微生物を他の目的に使用する場合には、凝集剤の混入が阻害要因になる。

【0005】 一方、重力式分離法のうち遠心分離法は、遠心力を利用して分離するため、微生物濃度を上げることも可能であるが、不溶性のSS成分の混入は避けられない。また、高遠心分離機を使用するため装置コストも高く、多くの電気エネルギーを消費するためランニングコストも高い。

【0006】 また、ろ過式分離法のうち精密ろ過では、ろ過材として膜(MF膜)を用いることが多く、ろ過材には無機系(セラミック、ガラス)と有機系(酢酸セルロース系、ニトロセルロース系、ポリアミド系、ポリスルホン等)があり、ろ過方式としては、全量ろ過方式とクロスフロー方式に分けられるが、ろ過効率が膜面積に依存することや目詰まりの問題を解決するためのモジュール設計面での工夫が要求される。また、ろ過には加圧又は減圧のための電気エネルギーを消費する。さらに、MF膜は、高価な上、定期的な交換が必要なため、ろ過剤のコストも無視できない。

【0007】 また、ろ過式分離法のうち助剤ろ過は、パン酵母等の比較的大きい微生物の分離には使用できるものの、細菌のように小さい微生物には適用が困難であり、また、ろ過機を使用するため、電気エネルギーを消費する。以上述べたように、従来の微生物濃縮法は、操作性、装置コスト及びエネルギー消費の上で課題が多い。

【0008】 近年、磁性体粒子を用いる磁気分離法が省エネルギー・高効率な分離法として注目され、免疫磁気ビーズによる微生物の分離や、超伝導磁石を用いた余剰汚泥の分離等が検討されている。

【0009】 しかし、免疫磁気ビーズ法は特異的な微生物の分離・検出には有効な方法であるが、高価な抗体が必要であり、ランニングコストも無視できない。また、微生物の種類に応じた免疫磁気ビーズを準備することが必要であり、汎用性のある微生物濃縮方法とはいえない。また、余剰汚泥の分離では、磁性体粒子の回収に加熱アルカリ処理や超音波処理が必要であり、生きた状態での微生物の回収には適用できない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】 このように、従来、微生物の濃縮方法としては、重力式分離法のうちの遠心分離法や、ろ過式分離法が多く用いられているが、いずれも操作性、コスト及びエネルギー消費の上で問題が多い。また、従来の磁性体粒子を用いる磁気分離法では、生きた状態での微生物の回収、コスト及び汎用性の点において、これらの課題を解決できていない。

【0011】 即ち、現状では、試料中の微生物を生菌として濃縮する方法において、遠心分離操作や膜分離操作等を必要とせず、しかも低コストで省エネルギーに有効

であり（エネルギー消費が少なく）、且つ簡便で汎用性のある微生物濃縮方法は見出されておらず、これらの課題を解決する微生物濃縮方法が望まれている。

【0012】本発明は、このような従来技術の問題点を悉く解消したものであって、試料中（試料水中）の微生物を生菌として濃縮する方法において、遠心分離操作や膜分離操作等を必要とせず、低成本で省エネルギーに有効であり、且つ簡便で汎用性のある微生物濃縮方法を提供することを目的とするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため試験検討した結果、種々の微生物が磁性体粒子に非特異的に吸着するが、その一方で、微生物以外の不溶成分はほとんど吸着しないこと、更に磁性体粒子に吸着した微生物をリン酸塩等の脱離処理液で脱離させ生菌として回収できることを見出し、これらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0014】即ち、請求項1に係る本発明は、試料中の微生物を磁性体粒子に吸着させ、磁石を利用した磁気分離を行う吸着・磁気分離工程と、前記磁性体粒子に吸着された微生物を脱離処理液で脱離し生菌を回収する脱離工程とを有することを特徴とする微生物濃縮方法を提供するものである。

【0015】請求項2に係る本発明は、磁性体粒子が、四三酸化鉄（Fe₃O₄）であることを特徴とする請求項1記載の微生物濃縮方法を提供するものである。

【0016】請求項3に係る本発明は、脱離処理液が、リン酸塩、硫酸塩及びエチレンジアミン四酢酸塩から選ばれる1種又は2種以上の組合せを含有する塩溶液であることを特徴とする請求項1又は2記載の微生物濃縮方法を提供するものである。

【0017】請求項4に係る本発明は、脱離処理液の塩濃度が、0.1～2.50 mol/Lであることを特徴とする請求項1乃至3のいずれかに記載の微生物濃縮方法を提供するものである。

【0018】請求項5に係る本発明は、脱離処理液のpHが、5.5以上8.5以下であることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の微生物濃縮方法を提供するものである。

【0019】

【発明の実施の形態】請求項1に係る本発明は微生物濃縮方法に関し、試料中の微生物を磁性体粒子に吸着させ、磁石を利用した磁気分離を行う吸着・磁気分離工程と、前記磁性体粒子に吸着された微生物を脱離処理液で脱離し生菌を回収する脱離工程とを有することを特徴とするものである。

【0020】まず、請求項1に係る本発明では、試料中の微生物を磁性体粒子に吸着させ、磁石を利用した磁気分離を行う吸着・磁気分離工程を行う。ここで、試料としては、微生物を含む試料であれば特に限定されず、例

えば、冷却塔用却水、下水処理水、排水処理水、温浴水、河川水などの環境水等が挙げられる。また、微生物の種類は特に限定されず、広く細菌、ウイルス、糸状菌等を含むものである。

【0021】この吸着・磁気分離工程においては、まず、上記試料中の微生物を磁性体粒子に吸着させる。ここで磁性体粒子の粒径は、磁性体粒子重量あたりの微生物に対する吸着面積が相対的に増える点で、小さいほど好ましいが、0.1 μm以下では磁石への吸着力が低下

するため、0.1 μm以上、100 μm以下であることが好ましい。このような磁性体粒子としては、磁性を持つ粒子状の物質であれば特に限定されず、例えばフェライト粒子等を用いることができ、その中でも、請求項2に記載するように、四三酸化鉄（Fe₃O₄）は、入手しやすく、取扱いが容易な点で好ましい。

【0022】試料中の微生物を磁性体粒子に吸着させる方法としては、例えば、試料溶液を磁性体粒子に添加して、必要に応じて振とう、攪拌しながら10分程度接触させる方法が挙げられる。磁性体粒子は、通常、試料の容量あたり、0.1～0.2%程度用いれば十分であるが、これに限定されるものではない。

【0023】請求項1に係る本発明における吸着・磁気分離工程において、微生物を吸着させた磁性体粒子の洗浄操作が必要な場合は、吸着させた微生物を脱離させず、且つ死滅させない条件を選択する必要がある。洗浄に用いる塩溶液の陰イオンは、磁性体粒子に吸着した微生物に影響がないように適宜選択する。そのため、洗浄操作には、塩化物イオン、硫酸イオン及び硝酸イオンから選ばれる1種又は2種以上の陰イオンの組合せを有する塩溶液を用いることができる。洗浄操作に用いる塩溶液は、リン酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩などのような、吸着した微生物を磁性体粒子から脱離させる物質を含有しないことが望ましい。また、洗浄操作に用いる塩溶液の塩濃度は、微生物を脱離させる性質が発現する濃度より充分低いことが必要である。

【0024】吸着・磁気分離工程においては、上述のように磁性体粒子に微生物を吸着させた後、磁石を利用した磁気分離、即ち、磁石を利用して微生物を吸着した磁性体粒子をその他の不溶成分（非吸着成分、水などの溶媒等）と分離（磁気分離）する。例えば、磁性流体の入った容器の外側から磁石を近づけて容器内壁に微生物を吸着した磁性体粒子を集めておいて、液相を除去することにより、容易に非吸着成分、水などの溶媒等を除くことができる。

【0025】請求項1に係る本発明においては、上記した如き吸着・磁気分離工程の後、前記磁性体粒子に吸着された微生物を脱離処理液で脱離し生菌を回収する脱離工程を行なう。この脱離工程において、磁性体粒子に吸着した微生物を脱離させるときに用いる脱離処理液としては、請求項3に記載するように、リン酸塩、硫酸塩及

びエチレンジアミン四酢酸塩から選ばれる1種又は2種以上の組合せを含有する塩溶液が好ましい。これらの中でも、リン酸塩溶液を脱離処理液として用いることにより、特異的に極めて回収率の高い脱離が可能となる。

【0026】また、脱離処理液の塩濃度は、通常、0.1~10 mol/L以上であり、好ましくは0.1~2.5 mol/Lであり、0.4~2.5 mol/Lがとりわけ好ましい。特にリン酸塩溶液を用いる場合には、0.4~2.5 mol/Lの範囲で充分な脱離が可能である。また、硫酸塩溶液を用いる場合には、5.0~25.0 mol/Lの範囲で充分な脱離が可能である。さらに、エチレンジアミン四酢酸塩溶液を用いる場合には、2~5 mol/Lの範囲で充分な脱離が可能である。一方、塩濃度の上限としては、微生物が死滅しない濃度であることが必要である。

【0027】なお、エチレンジアミン四酢酸塩溶液を脱離処理液として用いる場合、生菌としての回収率低下を避けるため、塩濃度を5.0 mol/L未満とすることが好ましい。回収率の低下の原因は明らかではないが、エチレンジアミン四酢酸塩の濃度が5.0 mol/L以上であると、微生物の細胞膜や細胞壁の構成成分であるマグネシウムなどの金属が、エチレンジアミン四酢酸によって除去され、その結果、生菌としての回収率が低下するものと考えられる。

【0028】なお、一般に界面活性剤は、担体等に吸着した細菌を脱離させるのに有効と考えられるが、請求項1に係る本発明においては、脱離が不充分となる点で、脱離処理液としては好ましくない。界面活性剤のうち、最も微生物に対して影響が少ないと思われる非イオン性界面活性剤の一種であるポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (Polyoxyethylene sorbitan monoleate) を、仮に脱離処理液として用いた場合でも、微生物の回収率は低いものとなってしまう。

【0029】さらに、脱離処理液のpHは、請求項5に記載するように、5.5以上8.5以下であることが好ましく、特に好ましい範囲は6.0以上7.5以下である。

【0030】請求項1に係る本発明は、以上の如き構成を有するものである。請求項1に係る本発明の微生物濃縮方法によれば、吸着・磁気分離工程及び脱離工程を経て、試料中の微生物を充分に濃縮し、生菌として回収することができる。従って、請求項1に係る本発明の微生物濃縮方法は、例えば、冷却塔水などの環境水等の試料水中のレジオネラ検査をはじめとする微生物検査や、菌数が非常に少ない試料中での微生物の遺伝子を検出するときなどに適用することが可能である。また、勿論、請求項1に係る本発明は上記のような環境水中の微生物検査における予備濃縮への適用の他に、微生物の大量濃縮の手段として有効なことは、言うまでもない。

【0031】

【実施例】次に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0032】実施例1【細菌の磁性体粒子への吸着】

磁性体粒子（キシダ化学（株）製「四三級化鉄」、32.5メッシュ；以下、「マグネタイト」という。）に対する各種細菌の吸着性を以下の方針で評価した。

【0033】(1) 供試細菌

供試細菌として、以下の細菌を用いた。

・バチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) IAM145

・スタフィロコッカス・アレウス (Staphylococcus aureus) IAM1011

・エシエリヒア・コリ (Escherichia coli) IAM12119

・シュードモナス・アエルギノーサ (Pseudomonas aeruginosa) IAM1514

・レジオネラ・ニューモフィラ (Legionella pneumophila) SG1 (環境分離株)

・レジオネラ・ドウモフィー (Legionella dumoffii) P4201

【0034】(2) 実験方法

5.0 mL平底フラスコに、蒸留水3.0 mLとマグネタイト6.0 mg (0.2%)を入れ、121°C・15分条件でのオートクレーブ滅菌を行ない、上記供試細菌を培養して調製した菌体懸濁液を、菌数が約10⁵ CFU/mLとなるように添加して、振とう培養機で振とうし (160 rpm、室温)、磁気分離により絶対的に非吸着菌分を採取して、残存する細菌数を計測した。

【0035】(3) 結果・考察

マグネタイトへの細菌吸着の経時変化をみるためにマグネタイトに吸着せずに残った細菌数を測定した結果を図1に示した。図1から明らかな通り、いずれの細菌も10分間の接触で殆ど100%がマグネタイトに吸着した。従って、マグネタイトへの細菌の吸着は、グラム陽性及び陰性の細菌のいずれにも共通することが認められた。また、このことは、マグネタイトへの吸着が、細菌以外の微生物でも共通して見られる現象であることを示すものであると考えられる。

【0036】実施例2【脱離処理液の検討及び洗浄操作に用いる塩溶液の検討】

40 大腸菌を用いて、マグネタイトに吸着した微生物を生菌として回収する脱離処理液の組成について試験を行なった。また、マグネタイトに吸着した微生物の洗浄操作に用いる塩溶液についても検討を行なった。

【0037】(1) マグネタイトへの吸着

実施例1の(2)実験方法と同様の条件及び手順で行なった。

【0038】(2) マグネタイトからの大腸菌の回収

大腸菌を吸着したマグネタイトを磁気分離により回収した後、蒸留水3.0 mLで1回洗浄した。次に、第1表に示す種類及び塩濃度の塩溶液を3.0 mL加え、充分に攪

拌した後、磁気分離により非吸着菌分を採取し、コロニーフレートにて生菌数を計測した。結果を第1表に示す。* 【表1】第1表【マグネタイトからの大腸菌の回収】

塩溶液の濃度 (m mol/L)	回収生菌数 (CFU/mL)				
	少磁選液	Na ₂ SO ₄	NaCl	NaNO ₃	EDTA
250	1.1×10 ⁴	4.1×10 ³	1.7×10 ³	70	1.1×10 ²
50	1.1×10 ⁴	1.4×10 ³	70	0	8.3×10 ²
10	1.1×10 ⁴	1.3×10 ²	6	20	1.3×10 ²
2	7.5×10 ³	1.3×10 ²	20	0	1.1×10 ²
0.4	5.1×10 ³	6	0	0	2.6×10 ²
0.08	1.8×10 ³	5	60	20	60
0.016	1.7×10 ²	40	20	0	0
0.0032	30	20	0	60	0
初期菌数	1.2×10 ⁴	5.8×10 ³	5.8×10 ³	5.8×10 ³	2.1×10 ³

【0040】(3) 考察

第1表から明らかに、リン酸緩衝液 (KH₂PO₄/Na₂HPO₄、pH 7.0) の場合、0.016 m mol/L 以上の濃度で大腸菌を生菌として回収することができ、特に 1.0 m mol/L 以上の濃度では、高い回収率で大腸菌を回収することができた。また、硫酸ナトリウム (Na₂SO₄) 水溶液の場合、2 m mol/L 以上の濃度で大腸菌を生菌として回収することができ、特に 5.0 m mol/L 以上では、高い回収率で回収することができた。一方、0.4 m mol/L 以下の濃度ではほとんど大腸菌を回収することができなかった。

【0041】これに対し、食塩 (NaCl) 水溶液の場合、2.50 m mol/L 以上の高濃度の場合に僅かに大腸菌を回収できるに過ぎなかった。また、硝酸ナトリウム (NaNO₃) 水溶液では、濃度を 5.0 m mol/L ～ 2.5 0 m mol/L といった高濃度で変化させても殆ど生菌を回収できなかった。

【0042】また、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) 水溶液の場合、0.4 m mol/L 以上の塩濃度で生菌を回収することができ、特に濃度 1.0 m mol/L では、約 40% の大腸菌を生菌として回収できたが、5.0 m mol/L 以上の濃度では、逆に回収量が低下する傾向が見られた。これは、EDTA の濃度が高くなると、微生物の細胞膜や細胞壁の構成成分であるマグネシウムなどの金属が、EDTA によって除去され、その結果、生菌としての回収率が低下するものと考えられる。

【0043】これらの結果から、マグネタイトに吸着した微生物を脱離し生菌を回収するための脱離処理液としては、請求項3に記載するように、リン酸塩、硫酸塩及びエチレンジアミン四酢酸塩から選ばれる1種又は2種以上の組合せを含有する塩溶液を用いることが好ましく、特にリン酸塩を含有する塩溶液を用いることが最も好ましいことが明らかとなった。

【0044】また、請求項4に記載するように、脱離処理液として、リン酸塩、硫酸塩及びエチレンジアミン四酢酸塩の塩濃度が 1.0 m mol/L 以上、好ましくは 5.0 m

mol/L で充分な脱離が可能となること、特に、リン酸塩溶液を用いる場合には、リン酸塩の濃度が 0.8 m mol/L と低濃度のリン酸塩溶液であっても十分に微生物を脱離し、生菌として回収できることが分かった。

【0045】その一方で、マグネタイトに吸着した微生物の洗净操作に用いる塩溶液としては、硫酸塩濃度が 0.4 m mol/L 以下の塩溶液、塩化物塩溶液濃度が 5.0 m mol/L 以下の塩溶液を用いることにより、磁性体粒子に吸着した微生物に影響がないこと、及び、硝酸塩を含む塩溶液の場合は、硝酸塩濃度が 2.50 m mol/L であっても、磁性体粒子に吸着した微生物に影響がないことが明らかとなった。

【0046】なお、上記塩溶液とは別に、プラスチック担体等に吸着した細菌を脱離させるのに有効な界面活性剤による脱離について検討した。検討は、界面活性剤のうち、最も微生物に対して影響が少ないとと思われる非イオン性界面活性剤であるポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (Polyoxyethylene sorbitan monoleate) をさまざまな濃度に希釈して検討したが、いずれの濃度であってもリン酸塩溶液に比較して低い回収率であり、満足できる値ではなかった。

【0047】実施例3【磁性体粒子からの微生物の脱離へのpHの影響】

大腸菌を用いて、マグネタイトに吸着した微生物を生菌として回収する脱離処理液のpHの影響について試験した。

【0048】(1) マグネタイトへの大腸菌の吸着

実施例1の(2)実験方法と同様の条件及び手順で行った。

【0049】(2) マグネタイトからの大腸菌の回収

pH 4.0～8.5 の 1.0 m mol/L リン酸緩衝液を使用して、実施例2と同様にして、マグネタイトから脱離・回収される大腸菌の生菌数を計測した。結果を第2表に示す。

【0050】

【表2】第2表【フェライトからの大腸菌の回収】

pH	回収量 (CFU/mL)
8.5	1.2×10 ⁴
8.0	1.5×10 ⁴
7.5	1.9×10 ⁴
7.0	2.3×10 ⁴
6.5	2.0×10 ⁴
6.0	1.9×10 ⁴
5.5	1.3×10 ⁴
5.0	6.9×10 ³
4.5	4.3×10 ³
4.0	6.0×10 ³
3.5	3.4×10 ³
3.0	4.0×10 ³
2.5	4.3×10 ³
初期菌数	2.4×10 ⁴

【0051】(3) 考察

第2表から明らかな通り、いずれのpHの脱離処理液を用いても、大腸菌を生菌として回収することができたが、特に、pHが5.5以上、8.5以下の場合は60%以上の回収ができ、pHが6.0以上、7.5以下ではほぼ完全に大腸菌を生菌として回収することができた。このことから、脱離処理液のpHは、5.5以上、8.5以下であると、マグネットに吸着した微生物を脱離し生菌を回収することができ、特に、6.0以上、7.5以下であると、より高い回収率で生菌を回収できることが分かる。

【0052】実施例4 (レジオネラ属細菌の濃縮分離) レジオネラ属細菌を用いて、本発明の微生物濃縮方法の効果を確認した。比較のため、遠心分離機を用いた遠心分離法による濃縮(10,000 rpm、30分)も並行して実施した。

【0053】(1) マグネットへの吸着・磁気分離 滅菌脱イオン水1000mLに、予め培養したレジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) SG-1(以下、単に「レジオネラ」という。)を10³ CFU/100mLとなるように懸濁させた。マグネット1gを添加し、5分間攪拌した後、磁石を利用して磁気分離を行ない、非吸着画分を捨て、滅菌脱イオン水100mLを加え、洗浄した。

【0054】(2) マグネットからのレジオネラ属細菌の脱離回収

吸着・磁気分離後の磁性体粒子に、脱離処理液として10mM/L/シリコン酸緩衝液(pH 7.0)を10mL加え、良く攪拌した。次いで、磁気分離によりレジオネラ

を含む脱離処理液を回収した。この脱離処理液100μLをレジオネラ検出用のG P V C α培地に接種し、コロニー数を計測した。

【0055】(3) 結果

本発明の微生物濃縮方法による操作で回収されたレジオネラ生菌数は、2.5×10⁴ CFU/100mLであった。一方、従来の遠心分離法でのレジオネラ生菌数は2.0×10⁴ CFU/100mLであり、両者はほぼ同じ回収率であった。このことから、本発明の微生物濃縮方法によれば、従来の遠心分離法と同様の精度でレジオネラを生菌として回収できることが分かる。

【0056】以上より、試料中の微生物を磁性体粒子に吸着させ、磁石を利用して磁気分離を行う吸着・磁気分離工程と、前記磁性体粒子に吸着された微生物を脱離処理液で脱離し生菌を回収する脱離工程とを有することを特徴とする請求項1に係る本発明の微生物濃縮方法によれば、環境水等の試料中に生存している微生物を生菌として高い回収率で回収し濃縮できることが明らかとなった。

【0057】

【発明の効果】本発明の微生物濃縮方法によれば、環境水等の試料中に生存している微生物を生菌として高い回収率で回収し濃縮することができる。また、本発明の微生物濃縮方法は、従来の遠心分離法やろ過式分離法等の微生物濃縮方法と比較して、遠心分離操作や膜分離操作等を必要としないため、操作性に優れている。さらに、本発明の微生物濃縮方法は、高価な遠心分離機や膜ろ過材をも必要としないため、コスト及びエネルギー消費の上での問題もない。

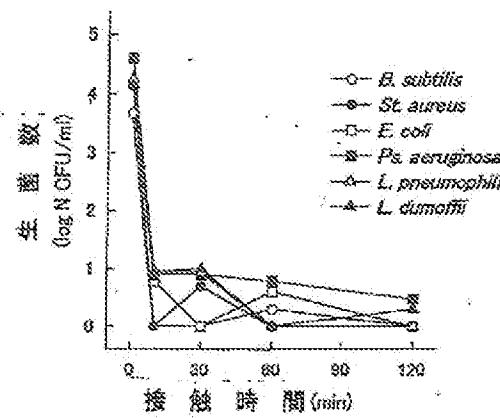
【0058】そして、本発明の微生物濃縮方法は、従来の磁性体粒子を用いる磁気分離と比較しても、微生物を生菌として回収することができ、また、対象となる微生物の種類に応じた用具も必要ないことから、汎用性に優れている。さらに、高価な抗体を必要としないことから、コストの上での問題もない。

【0059】よって、本発明の微生物濃縮方法は、例えば冷却塔水等の環境水中のレジオネラ検査をはじめ、菌数が非常に少ない試料中の微生物の遺伝子を検出するときなどに適用することができる。また、本発明の微生物濃縮方法は、環境水中の微生物検査における予備濃縮への適用の他、微生物の大量濃縮の手段としても有効である。

【図面の簡単な説明】

【図1】マグネットに吸着せずに残った細菌数の経時的变化を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

Fターム(参考) 48063 QA01 QQ06 QQ07 QQ10 QQ18
QR41 QR50 QS12 QS15 QS40
48065 AA01X AA58X AA95X BD50
CA46